

学位授与番号	乙第 1635 号
学位授与年月日	平成 19 年 9 月 5 日
氏 名	人見 嘉哲
学位論文題目	Disposition of Protein-bound 3-nitrotyrosine in Rat Plasma Analysed by a Novel Protocol for HPLC-ECD (新規 HPLC-ECD プロトコールによるラット血漿中における 3- ニトロチロシンの定量)
論文審査委員	主 査 教 授 中村 裕之 副 査 教 授 西條 清史 山本 博

### 内容の要旨及び審査の結果の要旨

アレルギー性疾患や生活習慣病の病態には、一酸化窒素 (Nitric oxide, NO) の関与が強く示唆されてきた。しかし、NO の半減期は非常に短く、NO の生成量と病態の関係は良く分かっていない。NO 産生の定性的マーカーとされる 3-ニトロチロシン (NTyr) は、比較的安定な物質であり、様々な分析方法が開発されてきた。しかし、タンパク質に含まれる NTyr の定量は技術的に難しく、未だ標準的な分析方法が確立されていない。本研究では、HPLC-電気化学検出法 (ECD) を用いた NTyr 定量法の開発を行い、ラット血漿タンパクに含まれる NTyr の動態を検討し、以下の結果を得た。

1. 逆相カラムを用いた HPLC による NTyr 分離条件を最適化し、NTyr のカラム保持時間を制御するためのパラメーターを明らかにした。
2. タンパク試料中の NTyr 分離には、従来の機器が耐えられない pH3.0 以下の強酸性移動相を用いる必要があり、製造元と共同で機器の改良を行った。
3. NTyr 検出特異性を向上させるために、ECD 還元セル、酸化検出セルに対する加電圧を検討し、タンパク試料中の NTyr を定量的に検出する条件を決定した。また、試料中のピークと NTyr 標準化合物のボルタモグラムを比較検討し NTyr の同定を行った。
4. ラット血漿タンパクに含まれる NTyr 量は、LPS 投与、非投与サンプルで  $593.6 \pm 53.8$  fmol/mg と  $114.4 \pm 27.6$  fmol/mg であった。質量分析法を用いた比較的信頼性が高い報告と同程度であった。
5. *in vitro* でニトロ化したラット血漿タンパクをラットに静注し、血漿タンパク中の NTyr の量を経時的に測定した結果、NTyr の半減期は約 63 時間であった。
6. 血漿タンパク中の NTyr 量は、LPS 投与後 3 時間より増加し始め、24 時間をピークとして漸減し、投与後 7 日目にほぼ投与前のレベルに戻ることが分かった。

以上より、従来報告のない強酸性移動相を用いることで、HPLC-ECD 法による測定精度の高い NTyr 分析法を確立することができた。活性窒素ストレスを定量的に評価することは、NO や活性窒素分子種の生理機能を明らかにする上で必要不可欠である。従って、煩雑な前処理を必要とせず多検体処理に対応できる HPLC-ECD 法によって生体試料からニトロチロシンを定量できる意義は大きい。

本研究は、活性窒素ストレスを定量的に評価し、新しい対処方法の開発へ寄与することが期待され、活性窒素ストレスの関与が強く指摘されているアレルギー性疾患や生活習慣病の研究に貢献する価値ある論文として評価された。